

**TYPING OF HLA**

**Publication number:** JP6303998 (A)

**Publication date:** 1994-11-01

**Inventor(s):** UMEMOTO MISAOKO

**Applicant(s):** SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES

**Classification:**

- international: **C12Q1/68; G01N30/54; G01N30/88; C12Q1/68; G01N30/00; (IPC1-7): C12Q1/68**

- European:

**Application number:** JP19930117880 19930421

**Priority number(s):** JP19930117880 19930421

**Abstract of JP 6303998 (A)**

**PURPOSE:**To provide an easy typing method for polymorphism of HLA genes on a base sequence level. **CONSTITUTION:**The typing method consists of (1) denaturation of the DNA fragment containing a HLA gene to make single-stranded DNA, (2) annealing of the single-stranded DNA with typing probes specifically combining with the specific regions of HLA gene to form bound bodies between the objective DNA fragments and the typing probes, (3) contact of the bound bodies with an insoluble supporting body carrying an immobilized ligand specifically combining with the objective DNA fragments and (4) subsequent elution of the typing probes from the supporting body by increasing the temperature gradually and analysis of the elution pattern.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

**Family list**

1 application(s) for: **JP6303998 (A)**

**1 TYPING OF HLA**

**Inventor:** UMEMOTO MISAKO

**Applicant:** SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES

**EC:**

**IPC:** *C12Q1/68; G01N30/54; G01N30/88; (+3)*

**Publication info:** **JP6303998 (A)** — 1994-11-01

---

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-303998

(43)公開日 平成6年(1994)11月1日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 1 2 Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Z N A A 7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平5-117880

(22)出願日 平成5年(1993)4月21日

(71)出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72)発明者 梅本 みさ子

大阪府大阪市此花区島屋一丁目1番3号

住友電気工業株式会社大阪製作所内

(74)代理人 弁理士 西川 繁明

(54)【発明の名称】 HLAタイピング方法

(57)【要約】

【目的】 HLA遺伝子の多型性を塩基配列レベルで容易にタイピングできる方法を提供すること。

【構成】 (1)HLA遺伝子を含むDNA断片を変性させて1本鎖とした後、(2)HLA遺伝子の特定の領域に特異的に結合するタイピング用プローブとアニールさせて、目的DNA断片とタイピング用プローブとの結合体を形成させ、(3)しかる後、目的とするDNA断片と特異的に結合するリガンドを固定化した不溶性支持体に接触させて、目的DNA断片とタイピング用プローブとの結合体を該支持体に結合させ、(4)次いで、温度を徐々に上昇させることにより、タイピング用プローブを支持体より溶出させ、その溶出パターンを解析することを特徴とするHLAタイピング方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) HLA遺伝子を含むDNA断片を変性させて1本鎖とした後、(2) HLA遺伝子の特定の領域に特異的に結合するタイピング用プローブとアニールさせて、目的DNA断片とタイピング用プローブとの結合体を形成させ、(3) しかる後、目的とするDNA断片と特異的に結合するリガンドを固定化した不溶性支持体に接触させて、目的DNA断片とタイピング用プローブとの結合体を該支持体に結合させ、(4) 次いで、温度を徐々に上昇させることにより、タイピング用

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、個体のHLA遺伝子型を決定(タイピング)する方法に関し、さらに詳しくは、HLA遺伝子の多型性を塩基配列レベルで直接調べるタイピング方法に関する。本発明のHLAタイピング方法は、分子生物学、遺伝子工学、及びこれらに関連する産業分野において有用である。

## 【0002】

【従来の技術】主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)は、マウスでは第17染色体上にあり、ヒトでは第6染色体短腕にあるHLA(Human Leukocyte Antigen)遺伝子複合体がこれに相当する。ヒトの組織的適合性は、HLA遺伝子により決定されるが、HLA遺伝子及びHLA抗原には、高度の多型性が見られる。

【0003】HLA抗原は、免疫応答や疾患感受性などの生体防御機構に深くかかわっている。HLA領域の遺伝的変異の検出は、移植に際し、HLA遺伝子が合致した提供者(ドナー)と受容者(レシピエント)のペアを選び出し、移植片の拒絶反応を最小限に抑制するための組織のタイピングに有用である。提供者と受容者とが遺伝的に近いほど、移植の成功率は高くなる。また、HLAタイピングは、自己免疫疾患に対する遺伝的感受性を知る上で重要な情報を提供する。さらに、HLA遺伝子座は、高度の多型性を示すため、HLAタイピングは、法医学における個人鑑定、親子鑑定などに応用することができる。

【0004】従来、HLAタイピングは、リンパ球に対する微量細胞毒試験(血清学的方法)やリンパ球混合培養(細胞学的方法)などにより、HLA抗原をタイプする方法によって行われてきた。これに対して、近年、HLA遺伝子の多型性を塩基配列レベルで直接調べるDNAタイピング法について、多くの提案がなされている。これらのDNAタイピング法は、免疫学的タイピング法に比べて、鋭敏でより正確な方法である。

【0005】DNAレベルでのHLAタイピング法としては、例えば、PCR-RFLP(Restricti

on Fragment Length Polymorphism)法、PCR-SSO(Sequence Specific Oligonucleotide)法などが代表的なものとして知られている(PCR実験マニュアル, p. 227-235; 実験医学, Vol. 8, p. 1094-1099)。

【0006】PCR-RFLP法は、PCR(Polymerase Chain Reaction)によりHLA抗原遺伝子の多型性に富む領域を選択的に増幅させ、この増幅したDNAに対して対立遺伝子(allele)特異的な塩基配列を認識、切断する制限酵素を用いて、切断されるか否かを電気泳動により検出する方法である。しかしながら、この方法は、タイピングすべき遺伝子領域の塩基配列が明らかにされている必要があること、多種類の制限酵素を必要とすること等の欠点がある。

【0007】PCR-SSO法は、PCRにより増幅したDNAをアロ抗原特異的なオリゴヌクレオチドプローブに対してハイブリッドするか否かで決定する方法である。PCR-SSO法におけるドットプロット法では、目的とするHLA遺伝子をPCRにより増幅した後、メンブレンにドットプロットにより固定化し、各メンブレンを標識したプローブとハイブリダイゼーションさせ、結合したプローブを酵素反応またはオートラジオグラフィなどで検出する。PCR-SSO法におけるリバースドットプロット法では、オリゴヌクレオチドプローブを膜に固定し、標識されたPCR生成物をハイブリダイゼーションして、特異的に結合したPCR生成物を酵素による発色反応等により検出する(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, p. 6230-6234, 1989)。

【0008】しかし、従来のPCR-SSO法では、プローブと目的DNA断片が結合したときにしか、シグナルが得られないため、1つのプローブより得られる情報量が少なく、そのため、HLAタイピングのように複雑なDNAの多型性を解析するためには、多数のプローブを用いる必要がある。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、HLA遺伝子の多型性を塩基配列レベルで容易にタイピングできる方法を提供することにある。本発明者は、相補的なDNA-DNAハイブリッド形成における相互作用の強さに着目した。DNA-DNAハイブリッドの融解温度(Tm)は、安定性に依存し、DNA同士の塩基配列が完全に相補的である場合には、高い温度までハイブリッドを形成しているが、一か所以上にミスマッチ(不適正塩基対)がある場合には、安定性が格段に低下し、低い温度で解離してしまう。そして、ミスマッチの種類によっても融解温度が異なる。

【0010】そこで、分析したいDNA領域に相補的な

配列を持つオリゴヌクレオチドプローブ（プローブDNA）を作製し、試料DNA中の目的DNAとプローブDNAとのハイブリッドを形成させた後、プローブDNAと目的DNAの融解温度を解析すると、試料DNA中に含まれる目的DNAの該領域に関する情報が得られ、これより領域内の塩基配列を推定できる。

【0011】また、目的とするDNA断片を捕獲するため、目的とするDNA断片に相補的な塩基配列を持つDNAをリガンドとして固定化した不溶性支持体を用いることにより、プローブDNAと目的DNAのハイブリッド形成物を支持体上に固定化させ、次いで、プローブDNAと目的DNAの融解は、プローブDNAがこの支持体より解離することにより検出できる。

【0012】不溶性支持体をカラム化して、カラム温度を精密に制御しながら徐々に温度を上昇させてプローブDNAを解離させることにより、プローブDNAの解離温度を正確に測定でき、これを解析することでHLAタイピングが可能である。本発明は、これらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】かくして、本発明によれば、（1）HLA遺伝子を含むDNA断片を変性させて1本鎖とした後、（2）HLA遺伝子の特定の領域に特異的に結合するタイピング用プローブとアニールさせて、目的DNA断片とタイピング用プローブとの結合体を形成させ、（3）しかる後、目的とするDNA断片と特異的に結合するリガンドを固定化した不溶性支持体に接触させて、目的DNA断片とタイピング用プローブとの結合体を該支持体に結合させ、（4）次いで、温度を徐々に上昇させることにより、タイピング用プローブを支持体より溶出させ、その溶出パターンを解析することを特徴とするHLAタイピング方法が提供される。

【0014】以下、本発明について詳述する。本発明で使用する不溶性支持体は、通常、膜状または粒子状であり、例えば、シリカゲル、多孔質ガラス、グラファイト等の無機高分子；ナイロン、ニトロセルロース、ポリテトラフルオロエチレン等の有機高分子；アルミニウム、アパタイト等の金属粒子；アルミナ等のセラミック粒子；等を例示することができる。また、これらの表面を化学的、物理的に改質したものであってもよい。支持体が粒子状である場合、粒子の大きさは、通常0.1～500μm、好ましくは1～100μm程度であり、粒子の孔径は、通常100～4000Å、好ましくは1000～4000Å程度である。

【0015】不溶性支持体に固定化するリガンドは、合成オリゴヌクレオチド（合成DNA）である。リガンドの長さは、タイピング用プローブより長いことが好ましく、通常20～100base（塩基）、好ましくは30～60baseである。リガンドとする合成DNAの塩基配列は、目的DNA断片中の塩基配列と相補的な

ようにする。

【0016】リガンドと支持体の結合方法は、支持体に導入された各種の官能基（カルボキシル基、アミノ基、水酸基等）をそのまま、あるいは縮合剤や活性化剤（トレスクロライド、水溶性カルボジイミド等）で処理してから、アミノ基、チオール基等の官能基を末端に導入した合成DNAと反応させる。

【0017】タイピング用プローブは、合成オリゴヌクレオチド（合成DNA）であり、その長さは、通常15～50base、好ましくは20～30baseである。タイピング用プローブは、1種類でもよいが、目的とするHLA遺伝子の多型性に応じてタイピングを効率よく行うことができるように、通常、HLA遺伝子内の領域を数種類選び、複数種のプローブを設計する。

【0018】タイピング用プローブは、検出感度を上げるために、標識物質を結合させることができる。標識する物質としては、蛍光色素、ビオチン等のハプテン、アルカリフォスファターゼ等の酵素等が用いられる。蛍光色素としては、フルオレセイン、ローダミン、Europium等が用いられる。この時、フルオレセインとローダミンのように蛍光波長の異なる色素を数種用いれば、同時に2種類以上のタイピングプローブを検出することができ、迅速な分析が可能である。

【0019】標識物質の合成DNAへの結合方法としては、標識物質中の官能基（イソチオシアネート基、カルボキシル基、アミノ基等）をそのまま、あるいは活性化してから、アミノ基、チオール基等の官能基を持つ合成DNAと反応させる方法を用いる。標識物質は、通常、合成DNAの末端に結合させる。

【0020】本発明の方法では、目的DNA断片と特異的に結合するリガンドを固定化した不溶性支持体を固定相とするアフィニティークロマトグラフィーの手法を利用することが好ましい。また、迅速な処理を行うために、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用することが好ましい。

【0021】カラムのクロマト管は、通常、100kg/cm<sup>2</sup>の静水圧に耐え得るものであって、溶液に不活性のものであれば特に限定されない。例えば、ステンレス等の金属、高密度ポリエチレンやポリスチレン等のプラスチック、ガラス等の無機物質を用いることができる。クロマト管の内径は、通常1～20mm、好ましくは1～5mmである。クロマト管の長さは、通常1～30cm、好ましくは1～10cmである。

【0022】カラムへの送液の際の流速は、通常0.01～1ml/分、好ましくは0.05～0.5ml/分である。カラムに送液する溶液は、支持体やクロマト管を侵さないものであれば特に限定されない。例えば、NaCl、EDTA等の溶質を含む水溶液で、これにメタノール、エタノール、アセトニトリル等の有機溶媒が混合されていてもよい。

【0023】目的とするDNA断片の長さは、通常50 base~10kbase、好ましくは100~2kbaseで、PCRにより調製したもの、制限酵素処理または物理的な方法等で切断したもの、ベクターに組み込んだもの等を用いる。また、DNA断片は、1本鎖でも2本鎖でもよい。

【0024】カラムの温度制御は、恒温槽、カラムヒーター等を用いるが、カラム内の温度を正確に制御するには、特に恒温水槽が好ましい。温度上昇速度は、早すぎると変異の有無、種類の識別が困難となるが、遅すぎると分析時間が長くなるという問題がある。これより、通常0.1℃/分~3℃/分、好ましくは0.5℃/分~1.0℃/分程度とする。

【0025】タイピング用プローブと目的DNA断片との結合は、目的DNA断片を熱またはアルカリ処理等で変性させた後、タイピング用プローブを混合することによって行う。

【0026】また、このタイピング用プローブと目的DNA断片の結合物を一定の温度に保ったカラム内に入れることにより、カラム内の不溶性支持体に結合する。

【0027】本発明の方法では、(1)HLA遺伝子を含むDNA断片を変性させて1本鎖とした後、(2)HLA遺伝子の特定の領域に特異的に結合するタイピング用プローブとアニールさせて、目的DNA断片とタイピング用プローブとの結合体を形成させる。HLA遺伝子の特定の領域を複数選択し、かつ、これらと特異的に結合するタイピング用プローブも複数種類作成すると、以下の操作により、多数のタイプのHLA遺伝子数種類のタイピング用プローブによって正確にタイピングする\*

\*ことができる。

【0028】しかる後、前記処理を行った試料DNAを、(3)目的とするDNA断片と特異的に結合するリガンドを固定化した不溶性支持体に接触させて、目的DNA断片とタイピング用プローブとの結合体を該支持体に結合させる。リガンドを固定化した不溶性支持体は、カラムに詰めて、液体クロマトグラフィー装置により操作することが好ましい。次いで、(4)温度を徐々に上昇させることにより、タイピング用プローブを支持体より溶出させる。この場合、目的DNA断片の特定の領域とタイピング用プローブとが完全に相補的であれば、溶出温度が高く、ミスマッチがあれば溶出温度は低くなり、その温度は、ミスマッチの数や種類によって相違する。そこで、タイピング用プローブの溶出温度などの溶出パターンを解析すると、高度の多型性を示すHLA遺伝子のタイピングを容易に行うことができる。目的DNA断片を含む試料DNA断片は、PCR法により増殖したものを使用することが望ましい。

【0029】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明する。

【0030】[実施例1]

(1)HLA-DQAタイピング用プローブの設計  
HLA-DQA遺伝子は、表1に示すように1~4のタイプに分けられ、さらにタイプ1は、1.1、1.2、及び1.3のサブタイプに分けられる。

【0031】

【表1】

1.1:	TTTGATGGAGATGAGGAGTTCTACGTGGACCTGGAGAGGAAGGAGACTGCTGGCGGTGGCCTGAGTTCAGCAAAATTTGGAGGTTTGAACCGCAGGG
	PR-1 PR-2
1.2:	-----C-----
1.3:	-----C-----A-----
2:	-----C-----T-----T-AA-T-CT-CA-G-C-A-A-----ATT
3:	-----C-----T-----T-A-T-CT-C-G-A-A-A-----ATT
	PR-3
4:	-----C-----G-----T-T-T-TTC-AC-----A-A-----ATT

この6種類のDQAタイプのホモ接合体及びヘテロ接合体の組み合わせ(全21通り)を全て区別できるように、表2に示すように3種類のプローブを設計した。

【0032】

【表2】

7

8

(プローブ配列)

PR-1 5' X GGT CCA GGT AGA ACT CCT CAT CTC C 3'

PR-2 5' X CAG TCT CCT TCC TCT CCA GGT CCA 3'

PR-3 5' X ACA GAG GCA ACT GCC AGA CAG TCT C 3'

(X:7ミリツク 2)

【0033】これらの配列のDNA (PR-1、PR-2、及びPR-3)をDNA合成機で合成し、常法によりFITC (フルオレセインイソチオシアネート)を標識した。これらのタイピング用プローブは、表1に示すHLA遺伝子 (サブタイプ1、1及びタイプ3)の特定の領域に特異的に結合するように設計されている (表1中に図示した符号PR-1、PR-2、及びPR-3に対応する領域)。

\* 【0034】(2)リガンド固定化カラムの作製  
HLA-DQA遺伝子より、各タイプに共通な45baseを選び、DNA合成機で表3に示す塩基配列を有するDNAを合成した。この合成DNAは、目的とするDNA断片と特異的に結合するリガンドである。

【0035】

【表3】

5' XTT TTT CAC GGA TCC GGT AGC AGC GGT AGA GTT GGA GCG TTT AAT C 3'

(X:7ミリツク 2)

【0036】このDNA6mgを等量の相補鎖DNA (保護用DNA)と300 $\mu$ lの1MNaCl中でアニーリングした後、0.04M NaHCO<sub>3</sub> (pH7.5)300 $\mu$ lを加え、300mgのトレスルクロライド活性化シリカゲル (Nucleosil 1000-OH、粒径7 $\mu$ m、孔径1000Å、Nagel社製)と24時間反応させた。反応終了後、過剰のDNAを除いた後に、2.4MTEACl中65℃で洗浄することにより、DNA2本鎖を解離させて1本鎖とし、DNA固定化支持体を作製した。(固定化量:2.0mg/g dry gel)

\*

※この支持体をパッキング用buffer (0.5M NaCl、10mMリン酸、1mM EDTA、pH7.0)に懸濁してバツカーに入れ、パッキング用bufferを送液し、カラム (φ2.1m×10m)に支持体を充填した。

【0037】(3)PCRによる目的DNA断片の作製  
表4に示すプライマーを用いたPCRにより、HLA-DQA領域の242bpを増幅した。

【0038】

【表4】

70-7A 5' GTG CTG CAG GTG TAA ACT TGT ACC AG 3'

70-7B 5' CAC GGA TCC GGT AGC AGC GGT AGA GTT G 3'

【0039】(4)目的DNA断片のカラムによる分析  
前記(2)で調製されリガンド固定化カラムを、高速液体クロマトグラフィー装置 (Waters社製)に接続した。(溶液:40%、EtOH、10mMリン酸buffer、1mM EDTA、pH6.7、流速0.1ml/分)

前記(3)で得られたPCR産物10 $\mu$ lを熱変性させた後、タイピング用プローブを混合してアニールさせ、30℃に保温したカラムにインジェクションした。10分間溶液を流してカラム内を洗浄した後、カラム温度を

上昇させ、(30℃~60℃、昇温速度0.5℃/分)溶出したタイピングプローブを蛍光検出器 (FS-8010、東ソー製)で検出した。

【0040】(5)分析結果の解析によるHLAタイピング

各タイピングプローブとHLA-DQA各タイプのDNA配列は、表5~7に示すように対応している。

【0041】

【表5】

## 《PR-1》

1.1        5' GGA GAT GAG GAG TTC TAC GTG GAC C    3' (A)  
 1.2, 1.3, 4    5' GGA GAT GAG CAG TTC TAC GTG GAC C    3' (B)  
 2,3        5' GGA GAC GAG GAG TTC TAC GTG GAC C    3' (C)  
 PR-1        3' CCT CTA CTC CTC AAG ATG CAC CTG GA    5'  
 (A) 1.1        → 完全相補  
 (B) 1.2, 1.3, 4 → 10-CC ミスマッチ  
 (C) 2,3        → 6-AC ミスマッチ

【0042】

\* \* 【表6】

## 《PR-2》

1.1, 1.2, 2,3    5' TGG ACC TGG AGA GGA AGG AGA CTG    3' (A)  
 1.3            5' TGG ACC TGG AGA AGA AGG AGA CTG    3' (B)  
 4            5' TGG ACC TGG GGA GGA AGG AGA CTG    3' (C)  
 PR-2        3' ACC TGG ACC TCT CCT TCC TCT GAC X    5'  
 (A) 1.1, 1.2, 2,3 → 完全相補  
 (B) 1.3        → 13-AC ミスマッチ  
 (C) 4        → 10-GT ミスマッチ

【0043】

【表7】

## 《PR-3》

2        5' AGA CTG TCT GGA AGT TGC CTC TGT    3' (A)  
 3        5' AGA CTG TCT GGC AGT TGC CTC TGT    3' (B)  
 PR-3    3' TCT GAC AGA CCG TCA ACG GAG ACA X    5'  
 (A) 2        → 完全相補  
 (B) 3        → 12-GC ミスマッチ  
 その他 → ミスマッチ多数(5~6個)

これらの表中の溶出パターンA、B、及びCは、溶出温度が相対的に高温(A)、中温(B)、及び低温(C)にそれぞれ対応している。

【0044】表8に示すように、この溶出パターンを解析することにより、これら3つのプローブを用いること30  
 によって、21種類のHLA-DQAのタイプを区別することができる。

【0045】

【表8】



(7)

特開平6-303998

11

12

	DQAタイプ	PR-1	PR-2	PR-3
ホモ接合体	1.1	A	A	—
	1.2	B	A	—
	1.3	B	B	—
	2	C	A	A
	3	C	A	B
	4	B	C	—
ヘテロ接合体	1.1,1.2	AB	A	—
	1.1,1.3	AB	AB	—
	1.1,2	AC	A	A
	1.1,3	AC	A	B
	1.1,4	AB	AC	
	1.2,1.3	B	AB	—
	1.2,2	BC	A	A
	1.2,3	BC	A	B
	1.2,4	B	AC	
	1.3,2	BC	AB	A
	1.3,3	BC	AB	B
	1.3,4	B	BC	
	2,3	C	A	A
	2,4	BC	AC	A
	3,4	BC	AC	B

【0046】各サンプルの溶出時間及び溶出温度の測定結果を表9に示す。

実験条件

溶出液：40%エタノール、1mM EDTA、10mM リン酸buffer (pH7.0)

流速：0.1ml/min

カラム温度：30℃-60℃ (0.5℃/min)

サンプルを入れて10分後より温度上昇

【0047】

10 【表9】

20

13

14

サンプル	PR - 1			PR - 2			PR - 3		
DQA タイプ	予想 パターン	溶出 時間 (分)	溶出 温度 (℃)	予想 パターン	溶出 時間 (分)	溶出 温度 (℃)	予想 パターン	溶出 時間 (分)	溶出 温度 (℃)
1	BC	19.28	34.6	A	37.10	43.6	B	22.50	36.2
(1,2,3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	B	21.49	35.7	B	20.91	35.5	-	-	-
(1,3,1,3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	A	35.50	42.7	A	36.83	43.4	B	22.43	36.2
(1,1,3)	C	18.39	34.2	-	-	-	-	-	-
4	C	18.88	34.4	A	36.52	43.3	B	22.64	36.3
(3,3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	B	20.68	35.3	A	36.81	43.4	-	-	-
(1,2,1,3)	-	-	-	B	20.89	35.4	-	-	-
6	BC	19.48	34.7	A	35.22	42.6	B	22.50	36.3
(1,3,3)	-	-	-	B	19.75	34.9	-	-	-
7	C	18.02	39.0	A	35.02	42.5	A	33.60	41.8
(2,2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	BC	19.10	34.6	A	35.90	43.0	A	32.90	41.4
(2,4)	-	-	-	C	30.90	40.5	-	-	-
9	BC	19.10	34.6	A	35.68	42.8	A	33.29	41.6
(1,2,2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	A	33.61	43.3	A	36.34	43.2	-	-	-
(1,1,4)	B	20.62	35.3	C	31.0	40.5	-	-	-

(脚注) 溶出温度 = (溶出時間 - 10) / 2 + 30℃

各プローブについての溶出パターンと平均溶出時間を表 10 に示す。

【0048】

【表10】

溶出パターン	溶出時間 (分)		
	PR-1	PR-2	PR-3
A	35.98	36.13	33.12
B	20.89	20.52	22.52
C	18.48	31.00	—
BC	19.28	—	—

【0049】

【発明の効果】本発明によれば、比較的少数のタイピング用プローブを用いて、迅速にHLAタイピングを行うことが可能であり、臓器移植、骨髄移植の際の適合性を調べたり、法医学における個人鑑定、親子鑑定、あるいは、疾患感受性の診断、人類学等の分野に利用することができる。

40

JP,06-303998,A

[Claim(s)]

[Claim 1] (1) After denaturing a DNA fragment containing an HLA gene and considering it as a single strand, (2) Make it anneal with a probe for typing specifically combined with a specific field of an HLA gene, Make combination of the purpose DNA fragment and a probe for typing form, and After an appropriate time [ (3) ], (4) Make an insoluble substrate which fixed ligand specifically combined with the target DNA fragment contact, combine combination of the purpose DNA fragment and a probe for typing with this base material, and rank second, An HLA typing method making a probe for typing eluted from a base material, and analyzing the elution pattern by raising temperature gradually.

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the typing method of investigating the polymorphism of an HLA gene directly on a base sequence level, in more detail about the method of determining the HLA gene type of an individual (typing). In molecular biology, gene engineering, and the field of industry relevant to these, the HLA typing method of this invention is useful.

[0002]

[Description of the Prior Art] A major histocompatibility complex (MHC) is on the 17th chromosome with a mouse, and the HLA (Human Leukocyte Antigen) gene complex in a 6th chromosome short bowl is equivalent to this in Homo sapiens. Advanced polymorphism is looked at by an HLA gene and the HLA antigen although human systematic affinity is determined by the HLA gene.

[0003] The HLA antigen is deeply concerned with biophylaxis mechanisms, such as an immune response and disease susceptibility. Detection of the heritable variation of an HLA region is useful on typing of the organization for selecting the pair of the donor (donor) with whom the HLA gene agreed, and a recipient (recipient) when transplanting, and inhibiting the rejection of a transplant to the minimum. The success percentage of transplantation becomes high, so that a donor and a recipient are

hereditarily near. When HLA typing gets to know the genetic susceptibility over an autoimmune disease, it provides important information. Since an HLA gene seat shows advanced polymorphism, it can apply HLA typing to the individual judgment in legal medicine, a paternity test, etc.

[0004]Conventionally, HLA typing has been performed by the method of typing an HLA antigen by the minute amount cytotoxic test (serological method) to a lymphocyte, mixed lymphocyte culture (the cytological method), etc. On the other hand, many proposals are made in recent years about the DNA typing method for investigating the polymorphism of an HLA gene directly on a base sequence level. These DNA typing methods are sharp and more exact methods compared with the immunological typing method.

[0005]As an HLA typing method in a DNA level, For example, the PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) method, PCR-SSO (SequenceSpecific Oligonucleotide) -- law etc. are known as a typical thing (an PCR experiment manual, p.227-235; the experimental medicine, Vol.8, p. 1094-1099).

[0006]The PCR-RFLP method makes the field which is rich in the polymorphism of an HLA antigen gene by PCR (Polymerase Chain Reaction) amplify selectively, as opposed to this amplified DNA -- allele (allele) -- it is the way electrophoresis detects whether it is cut or not using the restriction enzyme which recognizes a specific base sequence and is cut. However, this method has faults, such as that the base sequence of the genetic area which should type needs to be clarified, and needing the restriction enzyme of various sorts.

[0007]DNA which amplified the PCR-SSO method by PCR -- alloantigen -- it is the method of determining whether carry out a hybrid to a specific oligonucleotide probe. In the dot blotting in the PCR-SSO method. After amplifying the target HLA gene by PCR, it fixes by a dot blot in a membrane, hybridization is carried out to the probe which carried out the sign of each membrane, and an enzyme reaction or autoradiography detects the united probe. In the reverse dot blotting in the PCR-SSO method. Fix an oligonucleotide probe to a film and hybridization of the PCR output by which the sign was carried out is carried out, The coloring reaction by an enzyme, etc. detect a specifically united PCR output (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, p. 6230-6234-1989).

[0008]However, since a signal is obtained in the conventional PCR-SSO

method only when a probe and the purpose DNA fragment join together, In order for the amount of information obtained from one probe to analyze the polymorphism of complicated DNA like HLA typing few therefore, it is necessary to use many probes.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]The purpose of this invention is to provide the method of typing the polymorphism of an HLA gene easily on a base sequence level. this invention person paid his attention to the strength of the interaction in complementary DNA-DNA hybridization. Depending on stability, the base sequence of DNAs forms the hybrid to a high temperature, in being completely complementary, but the melting temperature ( $T_m$ ) of a DNA-DNA hybrid. when a mismatch (mismatched base pair) is in one or more places, stability will be markedly alike, will fall and will dissociate at a low temperature. And a melting temperature changes also with kinds of mismatch.

[0010]Then, the oligonucleotide probe (probe DNA) which has complementary arrangement in a DNA region to analyze is produced, If probe DNA and the purpose melting temperature of DNA are analyzed after making the hybrid of purpose DNA in sample DNA, and probe DNA form, the information about this field of purpose DNA contained in sample DNA is acquired, and the base sequence in a field can be presumed from this.

[0011]By using the insoluble substrate which fixed as ligand DNA which has a complementary base sequence in the DNA fragment made into the purpose, in order to capture the target DNA fragment, The hybridization thing of probe DNA and purpose DNA is made to fix on a base material, and it ranks second, and fusion of probe DNA and purpose DNA can be detected when probe DNA dissociates from this base material.

[0012]HLA typing is possible in being able to measure the dissociation temperature of probe DNA correctly and analyzing this by raising temperature gradually and making probe DNA dissociate, column-izing an insoluble substrate and controlling column temperature precisely. This invention comes to be completed based on these knowledge.

[0013]

[Means for Solving the Problem]After denaturing a DNA fragment containing (1) HLA gene and considering it as a single strand in this way according to this invention, (2) Make it anneal with a probe for typing specifically

combined with a specific field of an HLA gene, Make combination of the purpose DNA fragment and a probe for typing form, and After an appropriate time [ (3) ], (4) Make an insoluble substrate which fixed ligand specifically combined with the target DNA fragment contact, combine combination of the purpose DNA fragment and a probe for typing with this base material, and rank second, By raising temperature gradually, a probe for typing is made eluted from a base material, and an HLA typing method analyzing the elution pattern is provided.

[0014]Hereafter, this invention is explained in full detail. An insoluble substrate used by this invention is usually the shape of a film, or particle state, For example, metal particles, such as organic high polymer; aluminum, such as inorganic polymer; nylon, such as silica gel, porous glass, and graphite, a nitrocellulose, and polytetrafluoroethylene, and an apatite; ceramic particle [, such as alumina, ]; etc. can be illustrated. These surfaces may be reformed chemically and physically. When a base material is particle state, 0.1-500 micrometers of sizes of particles are usually about 1-10 micrometers preferably, and 100-4000 Å in an aperture of particles is usually about 1000-4000Å preferably.

[0015]Ligand fixed in an insoluble substrate is an synthetic oligonucleotide (synthetic DNA). The length of ligand has a long time more preferred than a probe for typing, and is usually 30 - 60base preferably 20 to 100 base (base). It is made for a base sequence of a synthetic DNA made into ligand to become as complementary as a base sequence in the purpose DNA fragment.

[0016]A coupling method of ligand and a base material various kinds of functional groups (a carboxyl group, an amino group, a hydroxyl group, etc.) introduced into a base material as it is, Or after processing with a condensing agent or activators (tresyl chloride, a water-soluble carbodiimide, etc.), functional groups, such as an amino group and a thiol group, are made to react to a synthetic DNA introduced into an end.

[0017]A probe for typing is an synthetic oligonucleotide (synthetic DNA), and the length is usually 20 - 30base preferably 15 to 50 base. Although the number of probes for typing may be one, they choose several kinds of fields in an HLA gene and usually design two or more sorts of probes type efficiently according to the polymorphism of an HLA gene made into the purpose.

[0018]The probe for typing can combine a marker, in order to raise detection sensitivity. As a substance which carries out a sign, enzymes, such as haptens, such as a fluorochrome and biotin, and alkali FOSUTAZE, etc. are used. Fluorescein, a rhodamine, Europium, etc. are used as a fluorochrome. If several sorts of coloring matter in which fluorescence wavelengths differ like fluorescein and a rhodamine is used at this time, two or more kinds of typing probes can be detected simultaneously, and quick analysis is possible.

[0019]as the coupling method to a synthetic DNA of a marker -- functional groups (an isothiocyanate group, a carboxyl group, an amino group, etc.) in a marker -- as it is -- or after being activated, a method of making it react to a synthetic DNA with functional groups, such as an amino group and a thiol group, is used. A marker is usually combined with an end of a synthetic DNA.

[0020]It is preferred to use the technique of affinity chromatography which makes a stationary phase an insoluble substrate which fixed ligand specifically combined with the purpose DNA fragment in a method of this invention. In order to perform quick processing, it is preferred to use high performance chromatography (HPLC).

[0021]The chromato-tube of a column can bear hydrostatic pressure of 100 kg/cm<sup>2</sup>, and especially if it is an inactive thing, it will not usually be limited to a solution. For example, mineral matter, such as plastics, such as metal, such as stainless steel, high density polyethylene, and polystyrene, and glass, can be used. An inside diameter of a chromato-tube is usually 1-5 mm preferably 1-20 mm. The length of a chromato-tube is usually 1-10 cm preferably 1-30 cm.

[0022]The rate of flow in the case of liquid sending to a column is usually a part for 0.05-0.5-ml/preferably by 0.01-1-ml/. A solution which sends the liquid in a column will not be limited especially if neither a base material nor a chromato-tube is invaded. For example, organic solvents, such as methanol, ethanol, and acetonitrile, may be mixed by this in solution containing solutes, such as NaCl and EDTA.

[0023]the length of the target DNA fragment -- usually -- 50base- 10 kbase, it is 100 - 2kbase preferably, and what was cut by what was prepared by PCR, restriction enzyme processing, or a physical method, a thing included in a vector, etc. are used. A single strand or 2 chains may be sufficient

as a DNA fragment.

[0024] Although a thermostat, a column heater, etc. are used for temperature control of a column, in order to control temperature in a column correctly, especially its constant temperature bath is preferred. If a rate of temperature rise is too early, existence of variation and discernment of a kind will become difficult, but when too late, there is a problem that analytical time starts for a long time. It is usually preferably considered as 0.5 \*\* a part for /- and a 1.0 \*\* part grade for /by part [ for 0.1 \*\*/- ], and 3 \*\*/from this.

[0025] Combination with a probe for typing and the purpose DNA fragment is performed by mixing a probe for typing, after denaturing the purpose DNA fragment by heat or alkali treatment.

[0026] It combines with an insoluble substrate in a column by putting in a connective of this probe for typing, and the purpose DNA fragment in a column maintained at a fixed temperature.

[0027] After denaturing a DNA fragment containing (1) HLA gene and considering it as a single strand, a specific field of (2) HLA genes is made to anneal with a probe for typing combined specifically, and combination of the purpose DNA fragment and a probe for typing is made to form in it in a method of this invention. Multiple selection of the specific field of an HLA gene is made, and if a probe for typing specifically combined with these is also created two or more kinds, an HLA gene of many types can be correctly typed with several kinds of probes for typing by the following operations.

[0028] After an appropriate time, an insoluble substrate which fixed ligand which combines specifically sample DNA which performed said processing with a DNA fragment made into the (3) purposes is made to contact, and combination of the purpose DNA fragment and a probe for typing is combined with this base material. As for an insoluble substrate which fixed ligand, it is preferred to stuff a column and to operate it with a liquid chromatography device. Subsequently, a probe for typing is made eluted from a base material by raising (4) temperature gradually. In this case, if completely complementary in a specific field and a probe for typing of the purpose DNA fragment, elution temperature is high, if there is a mismatch, elution temperature becomes low and that temperature is different according to a number and a kind of mismatch. Then, if elution patterns, such as elution



temperature of a probe for typing, are analyzed, an HLA gene which shows advanced polymorphism can be typed easily. As for a sample DNA fragment containing the purpose DNA fragment, it is desirable to use a thing increased by the PCR method.

[0029]

[Example] An example is given to below and it explains more concretely about this invention.

[0030] [Example 1]

(1) The design HLA-DQA gene of the probe for HLA-DQA typing is divided into the type of 1-4 as shown in Table 1, and Type 1 is further divided into the subtype of 1.1, 1.2, and 1.3.

[0031]

[Table 1]

1.1:	TTTGATGGAGATGAGGAGTTCTACGTGGACCTGGAGAGGAAGGAGACTGCCTGGCGGTGGCCTGAGTTCAGCAAATTTGGAGGTTTGAACCGCAGGG
	PR-1 PR-2
1.2:	-----C-----
1.3:	-----C-----A-----
2:	-----C-----T-----T---AA-T---CT---CA-G-C---A-A-----ATT
3:	-----C-----T-----T---A-T---CT---C-G---A-A-A-----ATT
	PR-3
4:	-----C-----G-----T---T-T-T---TTC---AC---A-A-----ATT

As shown in Table 2, three kinds of probes were designed distinguish all the combination (all the 21 kinds) of six kinds of this DQA type of homozygote, and heterozygote.

[0032]

[Table 2]

(7n-7配列)	
PR-1	5' X GGT CCA CGT AGA ACT CCT CAT CTC C 3'
PR-2	5' X CAG TCT CCT TCC TCT CCA GGT CCA 3'
PR-3	5' X ACA GAG GCA ACT GCC AGA CAG TCT C 3'
(X:73/77 2)	

[0033]DNA (PR-1, PR-2, and PR-3) of these arrangement was compounded with the DNA synthesis machine, and the sign of FITC (fluorescein isothiocyanate) was carried out with the conventional method. These probes for typing are designed combine with the specific field of the HLA gene (the subtype 1.1 and Type 3) shown in Table 1 specifically (field corresponding to numerals PR-1 illustrated all over Table 1, PR-2, and PR-3).

[0034] (2) From the production HLA-DQA gene of the ligand fixed column, 45base common to each type was chosen, and DNA which has a base sequence shown in Table 3 with a DNA synthesis machine was compounded. This synthetic DNA is ligand specifically combined with the DNA fragment made into the purpose.

[0035]

[Table 3]

5' XTT TTT CAC GGA TCC GGT AGC AGC GGT AGA GTT GGA GCG TTT AAT C 3' (X:7ミノリク 2)
--

[0036]After carrying out annealing of this DNA6mg to equivalent weight of complementary strand DNAs (DNA for protection) in 1MNaCl of 300microl, 0.04M NaHCO<sub>3</sub>(pH 7.5) 300microl was added and it was made to react to 300 mg of tresyl chloride activation silica gel (Nucleosil 1000-OH, the particle diameter of 7 micrometers, 1000 A in an aperture, the product made by Nagel) for 24 hours. After ending reaction, after removing superfluous DNA, by washing at 65 \*\* among 2.4MTEACl, the two DNA chain was made to dissociate, it was considered as the single strand, and the DNA fixed base material was produced. (The amount of immobilization: 2.0 mg/g dry gel) It was suspended to buffer for packings (0.5M NaCl, 10mM phosphoric acid, 1mM EDTA, pH 7.0), this base material was put into the packer, buffer for packings was sent, and the column (phi2.1mx10m) was filled up with the base material.

[0037] (3) 242bp of the HLA-DQA field was amplified by PCR using the primer shown in the production table 4 of the purpose DNA fragment twisted to PCR.

[0038]

[Table 4]

7a-7A	5'	GTG	CTG	CAG	GTG	TAA	ACT	TGT	ACC	AG	3'
7a-7B	5'	CAC	GGA	TCC	GGT	AGC	AGC	GGT	AGA	GTT	G 3'

[0039] (4) The ligand fixed column prepared with the analysis above (2) by the column of the purpose DNA fragment was connected to the high-performance-chromatography device (made by Waters). (Solution: A part for 40%, EtOH, 10mM phosphoric acid buffer, 1mM EDTA, and 0.1 ml of pH 6.7 rates-of-flow/)

After carrying out thermal denaturation of the PCR product 10mul obtained above (3), the probe for typing was made to mix and anneal and injection was carried out to the column which kept it warm at 30 \*\*. After pouring the solution for 10 minutes and washing the inside of a column, column temperature was raised and the fluorescence detector (FS-8010, TOSOH make) detected the typing probe eluted (a part for 30 \*\* - 60 \*\*, and heating-rate/of 0.5 \*\*).

[0040] (5) The DNA sequence of HLA typing each typing probe in the analysis of an analysis result and HLA-DQA each type supports Tables 5-7 so that it may be shown.

[0041]

[Table 5]

《PR-1》					
1.1	5'	GGA	GAT	GAG	GAG TTC TAC GTG GAC C 3' (A)
1.2, 1.3, 4	5'	GGA	GAT	GAG	CAG TTC TAC GTG GAC C 3' (B)
2, 3	5'	GGA	GAC	GAG	GAG TTC TAC GTG GAC C 3' (C)
PR-1	3'	CCT	CTA	CTC	CTC AAG ATG CAC CTG GX 5'
(A) 1.1	→ 完全相補				
(B) 1.2, 1.3, 4	→ 10-CC ミスマッチ				
(C) 2, 3	→ 8-AC ミスマッチ				

[0042]

[Table 6]

《PR-2》				
1.1, 1.2, 2, 3	5'	TGG ACC TGG AGA GGA AGG AGA CTG	3'	(A)
1.3	5'	TGG ACC TGG AGA AGA AGG AGA CTG	3'	(B)
4	5'	TGG ACC TGG GGA GGA AGG AGA CTG	3'	(C)
PR-2	3'	ACC TGG ACC TCT CCT TCC TCT GAC X	5'	
(A) 1.1, 1.2, 2, 3	→ 完全相補			
(B) 1.3	→ 13-AC ミスマッチ			
(C) 4	→ 10-GT ミスマッチ			

[0043]

[Table 7]

《PR-3》				
2	5'	AGA CTG TCT GGA AGT TGC CTC TGT	3'	(A)
3	5'	AGA CTG TCT GGC AGT TGC CTC TGT	3'	(B)
PR-3	3'	TCT GAC AGA CCG TCA ACG GAG ACA X	5'	
(A) 2	→ 完全相補			
(B) 3	→ 12-GC ミスマッチ			
その他	→ ミスマッチ多数(5~6個)			

Elution temperature supports [ elution pattern / in front / these / A, B, and C ] elevated-temperature (A), a moderate temperature (B), and low temperature (C) relatively, respectively.

[0044]As shown in Table 8, the type of 21 kinds of HLA-DQA is distinguishable by using these three probes by analyzing this elution pattern.

[0045]

[Table 8]

	DQA タイプ	PR - 1	PR - 2	PR - 3
ホモ接合体	1.1	A	A	—
	1.2	B	A	—
	1.3	B	B	—
	2	C	A	A
	3	C	A	B
	4	B	C	—
ヘテロ接合体	1.1,1.2	AB	A	—
	1.1,1.3	AB	AB	—
	1.1,2	AC	A	A
	1.1,3	AC	A	B
	1.1,4	AB	AC	
	1.2,1.3	B	AB	—
	1.2,2	BC	A	A
	1.2,3	BC	A	B
	1.2,4	B	AC	
	1.3,2	BC	AB	A
	1.3,3	BC	AB	B
	1.3,4	B	BC	
	2,3	C	A	A
	2,4	BC	AC	A
	3,4	BC	AC	B

[0046] The elution time of each sample and the measurement result of elution temperature are shown in Table 9.

Experimental-condition eluate: 40% ethanol, 1mM EDTA, 10mM phosphoric acid buffer (pH 7.0)

rate-of-flow: — 0.1 ml/min column temperature: — 30 \*\* - 60 \*\* (0.5 \*\* / min)

A sample is put in and it is a rise in heat from the 10-minute backward.

[0047]

[Table 9]

サンプル	PR - 1			PR - 2			PR - 3		
	予想 パターン	溶出 時間 (分)	溶出 温度 (°C)	予想 パターン	溶出 時間 (分)	溶出 温度 (°C)	予想 パターン	溶出 時間 (分)	溶出 温度 (°C)
1 (1,2,3)	BC —	19.28 —	34.6 —	A —	37.10 —	43.6 —	B —	22.50 —	36.2 —
2 (1,3,1,3)	B —	21.49 —	35.7 —	B —	20.91 —	35.5 —	— —	— —	— —
3 (1,1,3)	A C	35.50 18.39	42.7 34.2	A —	36.83 —	43.4 —	B —	22.43 —	36.2 —
4 (3,3)	C —	18.88 —	34.4 —	A —	36.52 —	43.3 —	B —	22.64 —	36.3 —
5 (1,2,1,3)	B —	20.58 —	35.3 —	A B	36.81 20.89	43.4 35.4	— —	— —	— —
6 (1,3,3)	BC —	19.48 —	34.7 —	A B	35.22 19.75	42.6 34.9	B —	22.50 —	36.3 —
7 (2,2)	C —	18.02 —	39.0 —	A —	35.02 —	42.5 —	A —	33.60 —	41.8 —
8 (2,4)	BC —	19.10 —	34.6 —	A C	35.90 30.90	43.0 40.5	A —	32.90 —	41.4 —
9 (1,2,2)	BC —	19.10 —	34.6 —	A —	35.68 —	42.8 —	A —	33.29 —	41.6 —
10 (1,1,4)	A B	33.61 20.62	43.3 35.3	A C	36.34 31.0	43.2 40.5	— —	— —	— —

(Footnote) Elution temperature = (elution time-10) the elution pattern about /2 +30 \*\* each probe and average elution time are shown in Table 10.

[0048]

[Table 10]

溶出パターン	溶出時間 (分)		
	PR - 1	PR - 2	PR - 3
A	35.98	36.13	33.12
B	20.89	20.52	22.52
C	18.48	31.00	—
BC	19.28	—	—

[0049]

[Effect of the Invention]According to this invention, it is possible to perform HLA typing promptly using a small number of probe for typing comparatively, and the conformity in the case of an organ transplantation and a bone marrow transplantation can be investigated, or it can use for fields, such as individual judgment in legal medicine, a paternity test or disease susceptibility diagnosis, and anthropology.

---

[Translation done.]